

EPO - Munich

02 Dez. 1998

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



Bescheinigung

REC'D	22 DEC 1998
W	

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine
Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenach-
weisverfahren"

am 28. März 1998 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol
C 12 Q 1/68 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 21. Oktober 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Zeichen: 198 14 001.0

Spezifisches und sensitives Nukleinsäurenachweisverfahren

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis von Nukleinsäuren, bei dem eine Amplifikation eines Teilstückes dieser Nukleinsäuren vorgenommen wird und wobei dieses Teilstück im Hinblick auf seine Basensequenz bestimmte Bedingungen erfüllen muß, sowie ein Reagenzkit enthaltend zwei Primer und eine Sonde, die dieses Teilstück definieren.

Eine der meist angewandten molekularbiologischen Techniken zum Nachweis von Nukleinsäuren ist Hybridisierung mit sequenzspezifischen Sonden zum Nachweis homologer Nukleinsäure-Sequenzen. Der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen ist von Bedeutung im Grundlagenbereich, jedoch von besonderer Bedeutung in verschiedenen Anwendungsfeldern, z. B. in den Bereichen medizinische Diagnostik, forensische Diagnostik, Lebensmitteldiagnostik, Umweltdiagnostik, Pflanzenschutz und Tiermedizin.

Als Sonde werden dabei entweder kurze Oligonukleotide (DNA oder RNA) oder längere Polynukleotide (DNA oder RNA) verwendet. Dabei haben die kürzeren Sonden gegenüber den längeren Sonden den Vorteil größerer Sequenzselektivität, wegen des kürzeren Hybridisierungsbereichs aber den Nachteil geringerer Sensitivität. Eine verbesserte Sensitivität und Sequenzselektivität wird mit PNA-Sonden (Peptidnukleinsäuren, z. B. WO 92/20702) erreicht, da diese Sonden eine höhere Bindungsaffinität zu Nukleinsäuren haben (höherer Tm) und durch eine höhere Basendiskriminierung gekennzeichnet sind (ΔT_m). Zusätzlich können Sonden zum Nukleinsäure-Nachweis Markierungsgruppen tragen, die entweder zum Fangen und/oder zur Detektion von Hybridkomplexen aus Sonde und nachzuweisender Nukleinsäure geeignet sind.

Zum Nukleinsäure-Nachweis durch Hybridisierung werden eine oder mehrere Sonden entweder zur Hybridisierung in Lösung oder auf festen Trägern verwendet. Bei Nukleinsäure-Nachweisen in Lösung spricht man von homogenen Nachweisformaten, bei Nachweis auf festen Trägern und/oder vermittelt durch feste Träger von heterogenen Nachweisformaten. Bei den heterogenen Nachweisverfahren kann die nachzuweisende Nukleinsäure auf dem festen Träger vorgebunden sein. Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen mit einer Lösung, die die Sonde enthält (z. B. dot blot). Umgekehrt kann die Sonde auf dem

festen Träger vorgebunden sein. Die Hybridisierung erfolgt durch Inkontaktbringen der gebundenen Sonde mit einer Lösung, welche die nachzuweisende Nukleinsäure enthält (z. B. reverse dot blot). Alternativ dazu kann der Komplex aus nachzuweisender Nukleinsäure und Sonde erst in Lösung gebildet werden und die Bindung an den festen Träger erst anschließend erfolgen. Bei homogenen Testformaten werden z. B. Sondenpaare verwendet, die endständig energieübertragende Gruppen tragen und die über Co-Hybridisierung an die nachzuweisende Nukleinsäure in unmittelbaren Kontakt gebracht werden und dadurch ein Signal erzeugen. Alternativ dazu können auch Sonden verwendet werden, die nach Bindung an die nachzuweisende Nukleinsäure durch enzymatische 5'-Nukleaseaktivität in Lösung von einem gequenchten in einen ungequenchten Zustand überführt werden.

Der Nachweis von Nukleinsäuren durch alleinige Sonden-Hybridisierung hat nur begrenzte Sensitivität. So ist selbst mit empfindlichen Detektions-Markierungsgruppen wie ^{32}P , Digoxigenin, Biotin, Fluorescein, Ruthenium-Chelate, Fluorescein, Rhodamin oder AMCA allein nur eine Sensitivität in pg- bis fg-Bereich möglich. Zum empfindlichen Nukleinsäure-Nachweis gerade im medizinisch-diagnostischen Bereich sind jedoch hohe Sensitivitäten im ag-Bereich und eine hohe Nachweisspezifität notwendig. Dies gilt sowohl für den Nachweis von körperfremden Nukleinsäuren z. B. in Form von Infektionserregern, als auch für den Nachweis von der An- oder Abwesenheit oder Veränderung körpereigener Nukleinsäuren. Hohe Nachweissensitivität und Nachweisspezifität ist aber auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

So müssen Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und HBV schon in wenigen Kopien nachgewiesen werden, um frühzeitig erfolgreiche medizinische Interventionsmaßnahmen, z. B. durch frühzeitige Arzneimittelbehandlung, ansetzen zu können. Für solch frühzeitige Nachweise von Infektionserregen ist der Nachweis von Nukleinsäure-Sequenzen der Infektionserreger von Vorteil, da wegen der Verfügbarkeit von Nukleinsäure-Vervielfältigungstechniken (Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren) ein empfindlicher Nachweis schon in einer frühen Infektionsphase (Latenzphase) möglich ist. Die Möglichkeit der gezielten Vermehrung des nachzuweisenden Agens gibt es nur im Fall von Nukleinsäuren, nicht aber im Fall von immunologischen Nachweisverfahren. Bei diesen Verfahren ist eine Steigerung der nachzuweisenden Infektionserreger-spezifischen Partikel nur über die humorale Immunantwort über Bildung von entsprechenden Infektionserreger-spezifischen Antikörpern möglich; diese Immunantwort erfolgt jedoch erst nach Ablauf der Latenzzeit und ist eine

Sekundärreaktion nach Infektion durch den Erreger. Daher hat der Nachweis über Nukleinsäure-Hybridisierung den Vorteil, daß z. B. der Infektionserreger direkt nach Infektion und sehr empfindlich nachgewiesen werden kann.

Der Erfolg von medizinischen Interventionsmaßnahmen ist jedoch auch davon abhängig, daß der Infektionserreger nicht nur frühzeitig mit hoher Sensitivität, sondern auch sehr spezifisch nachgewiesen werden kann. Zur gezielten Behandlung ist daher eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Infektionserregern, wie z. B. HAV, HBV, HCV, HIV, verschiedene Herpes-Viren, HPV, sowie die Unterscheidung einzelner Subtypen, wie

z. B. HIV-1 und HIV-2, von Bedeutung. Dabei ist aber auch entscheidend, daß quantitative Aussagen gemacht werden können und keine falsch-positiven oder falsch-negativen Ergebnisse erhalten werden, da solche falschen Ergebnisse u.U. gravierende therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen können. Dies setzt Richtigkeit und hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voraus. Daher muß der Nukleinsäure-Nachweis nicht nur sehr sensitiv, sondern auch sehr spezifisch und reproduzierbar sein. Der spezifische und sensitive Nukleinsäure-Nachweis muß auch rasch erfolgen, damit eine gezielte Therapie umgehend erfolgen kann.

Oftmals ist auch von Bedeutung, mehrere Infektionserreger wie z. B. HCV, HIV und HBV nebeneinander nachzuweisen, z. B. im Rahmen von Blutbanken-Screeningtests. Dies erfolgt bei derzeit gängigen Nukleinsäure-Nachwestests durch hintereinandergeschaltete Einzelbestimmungen der nachzuweisenden Infektionserreger. Dies hat den Nachteil, daß mehrere Bestimmungen hintereinander durchgeführt werden müssen, was gerade beim Screening von großen Specimen-Stückzahlen nachteilig ist. Im Rahmen dieser Nukleinsäure-Bestimmungen ist wünschenswert, sensitive und spezifische Testmöglichkeiten verfügbar zu haben, die z. B. eine rasche parallele Bestimmung mehrerer Infektionserreger nebeneinander in einer einzigen Probe ermöglichen (Multiplex-Bestimmung).

Beim Nachweis der An- oder Abwesenheit von körpereigener Nukleinsäure innerhalb bestimmter genomicscher Loci und/oder deren Veränderungen, wie z. B. ererbte, spontane oder eine Mischung aus ererbten und spontanen Mutationen, Deletionen, Inversionen, Translokationen, Rearrangements oder Triplet-Expansionen in Form von spezifischen und/oder polymorphen Veränderungen, ist ebenfalls die Verfügbarkeit spezifischer und sensibler Nukleinsäure-Nachweisverfahren von Vorteil. Die Verfügbarkeit spezifischer und sensibler Nukleinsäure-Nachweisverfahren ist jedoch nicht nur im medizinischen Sektor sondern auch in den anderen genannten Anwendungsbereichen von hoher Wichtigkeit.

Die bisherigen Testverfahren zum sensitiven und spezifischen Nachweis der An- oder Abwesenheit von Nukleinsäuren basieren auf der kombinierten Durchführung von Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen (Nukleinsäure-Vermehrung) und Nukleinsäure-Nachweisreaktionen (Detektion).

Die nachzuweisende Nukleinsäure wird dabei in einer für die Vermehrungsreaktionen zugänglichen Form eingesetzt, z. B. in Form von unbehandeltem oder behandeltem Probenmaterial und/oder Probenmaterial-Konzentrierung, z. B. durch Adsorption des unbehandelten oder behandelten Probenmaterials an die Oberfläche eines festen Trägers und an-

schließende Resorption von diesem festen Träger. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen. Durch diese festen Träger erfolgt keine substantielle Reinigung und/oder Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugänglichen Form möglich.

Andere Probenvorbereitungs-Verfahren enthalten gezielte Verfahrensschritte zur Nukleinsäure-spezifischen und/oder sequenzspezifischen Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. die Verwendung von festen Trägern mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden zur selektiven Bindung und Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure durch Nukleinsäure-spezifische Bindung und anschließende Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure. Bei dieser Art von festen Trägern sind Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen und/oder Nukleinsäure-Fangsonden an der Oberfläche der festen Träger notwendig. Daher sind zur Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren, z. B. im Rahmen von Multiplex-Verfahren, entweder mehrere feste Träger notwendig, was aufwendiger ist, oder feste Träger mit einer oder mehreren Bindungsgruppen und/oder mit multiplen oder mehreren Fangsonden. Multiple Fangsonden enthalten mehrere Bindungssequenzen für mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Diese Träger mit mehreren Bindungsgruppen und/oder mehreren und/oder multiplen Fangsonden sind jedoch aufwendiger herzustellen. Ebenfalls sind die Reaktionsbedingungen zur gezielten Bindung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäuren an Träger mit mehreren Bindungsgruppen

und/oder Fangsonden schwieriger einzustellen bzw. die Bindung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäurearten an eine Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppe oder an eine Fangsonde mit mehreren komplementären Hybridisierungssequenzen schwieriger einzustellen.

Die Vermehrung und der Nachweis der bereitgestellten nachzuweisenden Nukleinsäuren erfolgt in heterogenen oder homogenen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisformaten. Die Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen und Detektionreaktionen können entweder hintereinander (heterogene Testverfahren) oder gleichzeitig (homogene Testverfahren) erfolgen. Als Vermehrungsreaktionen werden entweder targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen, targetabhängige Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen oder Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Die Verwendung von Detektionsystemen zum Nachweis der vermehrten Nukleinsäuren erfolgt entweder über den Einbau von Nukleotiden und/oder die Verwendung von markierten Primern oder markierten Sonden. Die verwendeten Detektionssysteme enthalten entweder direkte oder indirekte Detektionsmarkierungen bzw. gekoppelte sekundäre und tertiäre Nachweiskomponenten. Die Detektion der vermehrten nachzuweisenden Nukleinsäuren kann jedoch auch durch spektroskopische oder physikalische Methoden erfolgen.

Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen haben den Nachteil geringer Sensitivität wegen der nicht-exponentiellen Signalvermehrung, erhöhten Störanfälligkeit durch stärkerer Tendenz zur Hintergrundsbildung durch die Vielzahl der Sondenkomponenten und der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein daran gekoppeltes Detektionssignal targetunabhängig vermehrt wird. Beispiele sind gekoppelte Signalkaskaden (z. B. SELF-Zyklus) oder signalgebende Sonden-Baum- oder -Bürstenstrukturen (z. B. branched DNA).

Die bisherigen Nukleinsäure-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierten targetabhängigen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen sind wegen der exponentiellen Signalvermehrung zwar sensitiver als die reinen Signal-Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren, haben aber wiederum den Nachteil der Bildung unspezifischer Detektionssignale, da nicht die nachzuweisende Nukleinsäure selbst, sondern lediglich ein davon in einer einleitenden targetabhängigen Primärrektion abgeleitetes Detektionssignal in Form eines Nukleinsäure-Reportermoleküls Targetsequenz-unabhängig enzymatisch vermehrt wird. Beispiele

sind die Q β -Replikationsreaktion, bei der ein Q β -Reportermolek $\ddot{\text{u}}$ l enzymatisch vermehrt wird, oder die Ligase-Kettenreaktion, bei der Teilst $\ddot{\text{u}}$ cke der Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Reportermolek $\ddot{\text{u}}$ le sequenzunabh $\ddot{\text{a}}$ ngig enzymatisch verknüpft werden.

Als Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsprodukte der bisher sensitivsten und spezifischsten exponentiellen targetspezifischen Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsreaktionen wie z. B. PCR (US-A-4,683,202 bzw EP-B-0 202 362), RT-PCR, SDA, NASBA (EP-A-0 329 822) oder TAM (WO 91/01384), wurden bisher jeweils einzel- oder doppelsträngige Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsprodukte durch targetsequenzabh $\ddot{\text{a}}$ ngige thermozyklische oder isotherme enzymatische Elongation gegenläufige Primer, die sequenzspezifisch für die nachzuweisende Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re sind und an die Enden der Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungseinheit (Amplikon) der nachzuweisenden Desoxyribo- oder Ribo-Nukleinsäuren oder deren Komplemente binden und somit die Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsprodukte begrenzen, erzeugt. Bei diesen Elongationsreaktionen werden alle 4 Basenspezifitäten eingebaut.

Die genannten Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungs-Nachweisverfahren mit integrierter targetspezifischer Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsreaktion sind wegen Targetsequenz-abh $\ddot{\text{a}}$ ngiger enzymatischer Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungszyklen am spezifischsten. Während lineare targetspezifische Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsreaktionen, wie z. B. die Cycling-Probe-Reaktion, nur zu begrenzter Sensitivität führen, ergeben exponentielle targetspezifische Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrungsreaktionen wie Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, RT-PCR, SDA) oder Transkriptions-basierte Reaktionen wie z. B. Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA) oder Transcription Mediated Amplification (TAM) bisher die sensitivsten und spezifischsten Signale.

Mischformen zwischen targetabh $\ddot{\text{a}}$ ngiger Signal-Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrung und targetspezifischer Nukleins $\ddot{\text{u}}$ re-Vermehrung, wie z. B. die Gap-filling Ligase-Kettenreaktion (gap-filling LCR, WO 90/01069), haben zwar gegenüber der nicht-modifizierten LCR einen targetabh $\ddot{\text{a}}$ ngigen Reaktionsschritt, dieser ist aber begrenzt auf limitierte Sequenzabschnitte bestehend aus lediglich 1 oder 2 Basenspezifitäten und damit limitierterer Target-Spezifität.

Für den Nachweis der entstandenen Nukleinsäure stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Der Nachweis der gebildeten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte über Fragment- oder Sequenz-Gelanalyse ist zeitaufwendig und nicht quantitativ. Der Nachweis überträgergebundene Dot-, Slot- oder Reverse-Dot-Blot-Verfahren ist ebenfalls zeitaufwendig und nicht quantitativ.

Quantitative sensitive und spezifische Bestimmungen der nachzuweisenden Nukleinsäuren wurden bisher im Rahmen von heterogenen oder homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten möglich, bei denen das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt entweder durch eingebaute Label oder durch Hybridisierung während oder nach Amplifikation mit einer für die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement spezifischen Sonde in einem Teil des durch Elongation entstandenen Sequenzabschnitts abgefangen wird. Exponentielle Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformate, bei denen eine Interkalation von Nukleinsäure-bindenden Farbstoffen erfolgt, sind zwar auch sensitiv, aber nicht sequenzspezifisch.

Bei den heterogenen Reaktionsformaten wird das Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt z. B. entweder über eine Primer-Fangmodifikation oder durch eine immobilisierte Fangsonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, auf einen festen Träger gebunden und über Einbau eines detektionsmarkierten Nukleotids, durch Hybridisierung mit einer detektionsmarkierten Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist, oder über eine Primer-Detektionsmodifikation nachgewiesen. In homogenen Reaktionsformaten erfolgte bisher der Nachweis z. B. über die Hybridisierung einer Sonde, die komplementär zu einem internen Sequenzabschnitt des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts ist und die einen gequenchten Fluoreszenz-Label trägt, wobei die Targetsequenz-abhängige enzymatische Aufhebung der Quenchung durch die Primer-Elongations-bedingte Freisetzung des gequenchten Fluoreszenz-markierten Nukleotids erfolgt, oder über die Anlagerung und/oder Interkalation eines detektierbaren Moleküls oder Gruppe.

Bei allen bisherigen quantitativen sensitiven und spezifischen heterogenen und homogenen targetspezifischen exponentiellen Nukleinsäure-Vermehrungs-Reaktionsformaten wurden bisher Nukleinsäure-Vermehrungseinheiten (Amplikons) verwendet, die neben den spezifischen Primer- und Sonden-Bindungssequenzen zusätzliche Sequenzen variabler Länge zwischen den flankierenden Primer-Bindungssequenzen und der internen Sonden-

Bindungssequenz enthielten. Diese fünfgeteilte Amplikonsstruktur resultierte in Amplikon-längen größer als die Summe der Sequenzlängen der beiden flankierenden Primer und der internen Sonde zwischen vorzugsweise 100 und 1000 Basen(paaren). Optimierungen der Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion durch verbesserte Enzymmischungen gingen bisher vielmehr hauptsächlich in Richtung längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte.

Kürzere Amplikonlängen wurden bisher lediglich zum Nachweis spezieller Sequenzen wie z. B. bei Triplet-Expansionen, für In-situ-Untersuchungen oder den Nachweis stark fragmentierter Nukleinsäuren im Rahmen der Altertumsforschung erzeugt. Diese kurzen

Amplikon-Längen wurden jedoch in zeitaufwendigeren Gelformaten oder In-situ-Formaten detektiert, die durch mangelnde Sensitivität und/oder fehlende Quantifizierung gekennzeichnet sind. Andere spezielle kurze Sequenzen wie Short Tandem Repeats, Short Interspersed Repetitive Elements Microsatellite Sequences oder HLA-spezifische Sequenzen wurden bisher lediglich als Primer- oder Sonden-Bindungssequenzen verwendet, bzw. in Kombination mit anderen Sequenzen.

Die fünfgeteilten Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben den Nachteil, daß sie neben den spezifisch Primer und Sonde bindenden Sequenzen noch zusätzliche Sequenzen beinhalten, die das Amplikon verlängern, und die die Gesamtspezifität im Hinblick auf die Spezifitäts-generierenden Primer- und Sonden-Bindungsreaktionen reduzieren.

Die bisher verwendeten längeren fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte haben ferner den Nachteil längerer Primer-Elongationszeiten und damit längere Gesamt-Testzeiten. Die Sensitivität ist auch begrenzt durch Plateaueffekte der beteiligten Enzyme und Substrate, die bei längeren Amplikons früher erreicht werden. Ein weiterer Nachteil längerer Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte ist eine zunehmende Kompetition zwischen Amplikon-Gegenstrang und Detektor- oder Fangsonde und somit reduzierter Sensitivität. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Möglichkeit der unspezifischen Bindung bedingt durch die zusätzlichen Sequenzen mit der Folge eines erhöhten Hintergrunds und dadurch geringerer Sensitivität (geringeres Signal-Rausch-Verhältnis). Ein weiterer Nachteil bei der Bindung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts an trägergebundene Fangsonden ist die sterische und kinetische Hinderung längerer Nukleinsäure-Moleküle; daher werden Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bisheriger Länge vor der Bindung durch die Fangsonde vorzugsweise fragmentiert. Ein weiterer Nachteil ist die erhöhte Anfälligkeit gegenüber Fragmentierung innerhalb der Amplikonsequenz und dadurch Zerstörung der Nukleinsäure-

Vermehrungseinheit; dies führt zu geringerer Reproduzierbarkeit. Ein weiterer Nachteil ist, daß längere Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei niedrigen Testtemperaturen von z. B. 37 °C, die bei gängigen Nukleinsäure-Analysegeräten vorgegeben sind, weniger spezifisch hybridisieren, da eine größere Differenz zur Schmelztemperatur besteht. Ein weiterer Nachteil von fünfteiligen Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten ist beim Nachweis mehrerer verschiedener Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte, daß unterschiedliche Nukleinsäure-Vermehrungslängen gebildet werden, die einen Multiplex-Nachweis erschweren.

Ziel der vorliegenden Erfindung war es, ein alternatives Nachweisverfahren für Nukleinsäuren bereitzustellen, welches Vorteile gegenüber den bisher beschriebenen Verfahren hat.

Eine spezielle Aufgabe der Erfindung bestand darin, ein targetabhängiges exponentielles Nukleinsäure-Vermehrungsverfahren zum hochsensitiven, hochspezifischen, reproduzierbaren und quantifizierbaren Nachweis einer oder mehrerer einzelsträngiger oder doppelsträngiger Nukleinsäuren bereitzustellen, welches insbesondere einen oder mehrere der genannten Nachteile vermeidet.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung war, unter Erhalt der Gesamtspezifität die Auswahl der Primer- und Sondensequenzen so flexibel zu gestalten, daß eine Bestimmung mehrerer verschiedener nachzuweisender Nukleinsäuren in einem vereinheitlichten Reaktionsformat unter Verwendung von vorzugsweise teilweise gleichen Primer- oder Sonden-Sequenzen möglich ist.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure enthaltend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann, in Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist, dadurch gekennzeichnet, daß die mit

Hilfe der Primer gebildeten Amplifikate eine Länge von weniger als 100 Nukleotide aufweisen.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens.

In Fig. 1 ist schematisch die in der vorliegenden Beschreibung verwendete Bezeichnungsweise für die Bereiche auf der nachzuweisenden Nukleinsäure gezeigt.

In Fig. 2 ist die entsprechende Bezeichnungsweise für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte der Primer sowie die Amplifikate (Amplikons) gezeigt. Ebenfalls ist gezeigt, daß die Amplifikate ein oder mehrere weitere Bereiche Y aufweisen können, die außerhalb des Bereiches liegen, der die von der nachzuweisenden Nukleinsäure stammende Sequenzinformation enthält.

In Fig. 3 ist schematisch gezeigt, wie im Falle der vorliegenden Erfindung die Bindesequenzen der Primer und Sonde angeordnet sind. Es ergeben sich verschiedene Alternativen I bis VI, je nachdem, ob und wie die Bindesequenzen überlappen. Es ist jeweils nur ein Strang des Amplifikats gezeigt. Dieselbe Anordnung (nur komplementär) kann für einen zweiten Strang des Amplifikats erstellt werden. Für die intermediär gebildeten Verlängerungsprodukte ergibt sich ein ähnliches Bild. Als Fall V und VI ist der Fall gezeigt, daß die Sonde neben der Bindesequenz D noch weitere, nicht mit dem Amplifikat Basenpaarungen ausbildende Bereiche X enthält, die gleich oder verschieden sein können. Zum Vergleich ist der Fall des Standes der Technik als VII gezeigt; die Sequenzen Z repräsentieren die zusätzlichen Sequenzen der fünfteiligen Amplikons.

In Fig. 4 ist eine für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens besonders geeignete Region des HCV-Genoms gezeigt, sowie eine Sequenz, aus welcher die Primer- und Sonden-Sequenzen bevorzugt ausgewählt werden. Diese zweite Sequenz ist dem nicht humanpathogenen Virus HGBV-B entnommen. Bei den hieraus gewählten Primer- und Sondensequenzen handelt es sich daher um nicht für HCV spezifische Sequenzen (J. Med. Virol. 48: 60-67).

Nukleinsäuren, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nachgewiesen werden können, können beliebigen Ursprungs sein, beispielsweise Nukleinsäuren viroiden, viralen, bakteriellen oder zellulären Ursprungs oder von Hefen oder Pilzen. Proben, in denen die nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement enthalten sind, sind z. B.

humane, tierische, bakterielle oder pflanzliche Flüssigkeiten, oder Flüssigkeiten aus Hefen oder Pilzen, Exkremeante, Abstriche, Zellsuspensionen, Kulturen oder Gewebs-, Zell- oder Flüssigkeits-Punktionen. Bevorzugt liegen die Nukleinsäuren in Lösung vor. Damit das erfindungsgemäße Verfahren seine Vorteile voll entfalten kann, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, wenn die nachzuweisende Nukleinsäure eine Größe von mindestens 40 bp aufweist. Die Nukleinsäure kann jedoch auch eine durch Klonierung, Amplifikation, in-vitro- und in-vivo-Vermehrung hergestellte Nukleinsäure sein.

Die nachzuweisende Nukleinsäure kann einzelsträngig (insbesondere bei RNA) oder doppelsträngig (insbesondere bei DNA) sein. Für den Fall doppelsträngiger Nukleinsäuren können beide Stränge vermehrt werden oder aber auch nur einer. Aus beiden Sorten von Nukleinsäuren können einzel- oder doppelsträngige Amplifikate gebildet werden, wovon einer oder beide zum weiteren Nachweis verwendet werden können. Entsprechend wird die Sequenz der Sonde oder der Sonden ausgewählt.

Der Probe oder einer Kontrollprobe können positive oder negative Kontrollnukleinsäuren oder Quantifizierungsstandards zugesetzt sein, die ähnlich oder gleich behandelt werden wie die nachzuweisenden Nukleinsäuren. Als Standards können beispielsweise interne oder externe heterologe oder homologe DNA- oder RNA-Standards, enthaltend Primer-Bindesequenzen homolog zu den Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren und heterologen Sonden-Bindesequenzen, verwendet werden. Umgekehrt ist aber auch die Verwendung von besonders im 3'-Priming-Bereich heterologen Primer-Bindesequenzen und homologen Sonden-Bindesequenzen möglich. Als Negativ-Kontrollen werden bevorzugt analoge Specimen eingesetzt, welche die nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement nicht enthalten.

Vor der Vermehrung wird die Probe bevorzugt einem oder mehreren Vorbehandlungsschritten unterzogen, um die nachzuweisenden Nukleinsäuren in eine vermehrungsfähige Form zu bringen. In einem ersten optionalen Schritt findet eine Vorbehandlung der Probe (Specimen) statt, durch die die Probe in eine Form gebracht wird, aus der die nachzuweisende Nukleinsäure in eine für die Überführung der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung geeignete Form gebracht wird.

Die Art der Vorbehandlung der Probe hängt von der Art der Probe und der Komplexität des biologischen Materials in der Probe ab. Bei humanen Körperflüssigkeiten wie z. B. Human-

Blut erfolgt in einer bevorzugten Ausführungsform zunächst eine Abtrennung von Blutzellen bei der Erzeugung von Plasma, Serum oder Blutzellkonzentraten. Durch diesen Trennschritt wird durch die Probenvorbehandlung die Komplexität des biologischen Probenmaterials in den resultierenden Fraktionen deutlich reduziert, ohne daß eine substantielle Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäure erfolgt. Im Fall von Sputum oder Abstrichen erfolgt eine Probenvorbehandlung, z. B. durch Suspendieren des Sputums bzw. des Abstrichs, im Fall von Urin z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Im Fall von Gewebspunktionen erfolgt eine Probenvorbehandlung z. B. durch Suspendierung und Behandlung mit einem Zellverbands-auflösenden Agens. Bei Cerebrosidal-Flüssigkeit erfolgt die Probenvorbehandlung z. B. durch Zentrifugation und Weiterverarbeitung der erhaltenen Fraktionen. Auch in diesen Fällen erfolgt durch die Probenvorbehandlung eine Reduktion der Komplexität des biologischen Probenmaterials.

Danach kann sich ein Schritt anschließen, in dem die nachzuweisende Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrung zugängliche Form überführt wird. Bei der Überführung der nachzuweisenden Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe in eine für die Vermehrungsreaktion zugängliche Form werden bevorzugt bekannte Methoden angewandt. In einer bevorzugten Ausführung erfolgt in einem ersten Reaktionsschritt eine Lysebehandlung der vorbehandelten Probe zur Freisetzung der nachzuweisenden Nukleinsäure, z. B. durch Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali. In einem zweiten Schritt wird die lysierte vorbehandelte Probe nach Zugabe von chaotropen Agentien, wie z. B. Guanidinium-Hydrochlorid oder Harnstoff, in An- oder Abwesenheit von löslichen Alkoholen, wie z. B. Isopropanol, an die Oberfläche eines festen Trägers und anschließende Resorption von diesem festen Träger konzentriert. Solche festen Träger sind z. B. feste Träger mit glashaltigen Oberflächen (z. B. Magnetpartikel, Glasvließe mit glashaltigen Oberflächen, Partikel, Mikrotiterplatten, Reaktionsgefäß, Dip-sticks oder miniaturisierte Reaktionskammern, die wiederum auch Teil von intergrierten Reaktionschips sein können). Durch diesen festen Träger erfolgt bevorzugt keine substantielle sequenzspezifische Reinigung und/oder Isolierung der nachzuweisenden Nukleinsäuren, sondern lediglich eine Probenmaterial-(Nukleinsäuren-)Konzentrierung und ggf. Inaktivierung und/oder Eliminierung von Inhibitoren für die darauffolgenden Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktionen. Durch diese festen Träger ist auch die Bereitstellung mehrerer nachzuweisender Nukleinsäure, z. B. im

Rahmen von Multiplex-Verfahren, in für die Nukleinsäure-Vermehrungs- und -Nachweis-Reaktionen zugängliche Form möglich.

In einer anderen Ausführung kann die Überführung der nachzuweisenden Nukleinsäure aus der vorbehandelten Probe nach Nukleinsäure-Freisetzung in einem ersten Schritt durch z. B. Proteinase K-Behandlung bei erhöhten Temperaturen oder bei Desoxyribonukleinsäuren durch Alkali erfolgen. In einem zweiten Schritt wird die lysierte vorbehandelte Probe zur Bindung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit festen Trägern in Kontakt gebracht, die z. B. mit Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen und/oder Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure zur selektiven Bindung modifiziert sind, und anschließend die gebundene nachzuweisende Nukleinsäure durch Dissoziation zwischen Bindungsgruppe und/oder trägergebundener Fangsonde und nachzuweisender Nukleinsäure wieder eluiert. Beispiele für Nukleinsäure-spezifische Bindungsgruppen sind PNA-Homopyrimidin-Oligomere wie z. B. (T)₇-PNA oder Nukleinsäure-bindende niedermolekulare Substanzen wie z. B. Nukleinsäure-Interkalatoren, Major groove-Binder oder Minor groove-Binder. Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind Nukleinsäure-Oligomere oder Nukleinsäure-Polymere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Weitere Beispiele für Fangsonden spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure sind PNA-Oligomere mit Bindungssequenzen für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren. Die Bindung der Nukleinsäure-spezifischen Bindungsgruppen oder der Fangsonden an den festen Träger kann mit oder ohne Zwischen-schaltung von Abstandshaltern (Spacern) entweder kovalent oder über Bindungspaares wie z. B. Biotin:Streptavidin oder Ni:Chelat erfolgen.

Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuresequenzen können linear oder zirkulär sein und können Sequenz-Modifikationen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder/und methyliert, gecappt, polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein. Die zur Vermehrung eingesetzten Nukleinsäuren oder deren Komplement können natürlichen Ursprungs sein, fragmentiert, modifiziert oder enzymatisch, z. B. mit dem Enzym Uracil-Deglykosylase (ung), oder physikalisch vorbehandelt, vorvermehrt, oder chemisch, photochemisch oder enzymatisch erzeugt sein, z. B. durch chemische Oligonukleotidsynthese oder in-vitro-Replikation, in-vitro-Reverse Transkription oder in-vitro-Transkription.

In dem ersten essentiellen Verfahrensschritt des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure amplifiziert. Im folgenden wird dieses Teilstück auch Amplikon genannt. Dieses enthält zwingend den Sequenzbereich zwischen den äußeren Enden der Bindesequenzen bzw. des Komplements davon der Primer (den Primerbindungsbereichen), und enthält den Bindebereich E der Sonde bzw. das Komplement davon. Gemäß der vorliegenden Erfindung ist das Amplikon (bevorzugt die Gesamtlänge der Sequenzen der Bereiche A, B und C) kürzer als 100 Nukleotide, besonders bevorzugt kürzer als 60 Nukleotide, jedoch bevorzugt länger als 40 Nukleotide. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Gesamtlänge der Amplifikate nicht doch größer sein kann, z. B. wenn die Primer zusätzlich Nukleotide aufweisen, die nicht innerhalb der Bindebereiche liegen. Es werden solche Vermehrungsmethoden eingesetzt, die eine Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement erlauben, die in der Bildung von Tripartite-Mini-Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten münden [Mini Chain Reaction (MCR)]. Hierfür stehen prinzipiell alle Nukleinsäureamplifikationsverfahren zur Verfügung, die im Stand der Technik bekannt sind. Bevorzugt werden targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet. Besonders bevorzugt werden theoretisch exponentielle targetspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen verwendet, bei denen eine antiparallele Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement erfolgt, wie z. B. Elongations-basierte Reaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion (PCR für Desoxyribonukleinsäuren, RT-PCR für Ribonukleinsäuren). In besonderer Weise bevorzugt werden thermozyklische exponentielle Elongations-basierte Nukleinsäure-Vermehrungsreaktionen wie z. B. die Polymerase-Kettenreaktion verwendet. Die zur Vermehrung eingesetzten nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplement können in Form von einzelsträngigen oder doppelsträngigen Desoxyribonukleinsäuren oder Ribonukleinsäuren vorliegen. Ziel der Vermehrungsreaktionen ist die Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks der nachzuweisenden Nukleinsäure. Unter einem Amplifikat wird daher jede unter Verwendung von Sequenzinformation der Nukleinsäure hergestellte Molekülspezies verstanden. Insbesondere handelt es sich um Nukleinsäuren. Der Begriff "Amplifikate" beinhaltet sowohl einzelsträngige als auch doppelsträngige Nukleinsäuren. Ein Amplifikat kann neben den die Sequenzinformationen der zugrunde liegenden Nukleinsäure enthaltenden Bereichen (Amplikon) außerhalb der voneinander wegweisenden Enden der Primerbindungsstellen noch weitere Bereiche enthalten, welche nicht in direkter Relation mit Sequenzen der zu amplifizierenden Nukleinsäure stehen.

Bevorzugt kommen gerade solche Sequenzen einer Länge von mehr als 15 Nukleotiden nicht auf der nachzuweisenden Nukleinsäure oder ihrem Komplement vor und können mit dieser nicht durch direkte Basenpaarung hybridisieren. Amplifikate können somit entweder mit der nachzuweisenden Nukleinsäure selbst oder mit deren Komplement hybridisieren. Amplifikate sind beispielsweise auch die Produkte einer asymmetrischen Amplifikation, d. h. einer Amplifikation, bei der die beiden Stränge in unterschiedlicher Menge gebildet werden (z. B. durch Einsatz unterschiedlicher Mengen an Primern) oder einer der beiden Stränge wieder zerstört wird (z. B. durch RNase).

Unter einem Primer im Sinne der vorliegenden Erfindung wird ein Molekül verstanden, welches über Basenpaarungen an eine Nukleinsäure T oder deren Komplement binden kann und welches, bevorzugt enzymatisch, verlängert werden kann. Bevorzugt sind Oligonukleotide, die an ihrem 3'-Ende unter Verwendung der nachzuweisenden Nukleinsäure oder einem Komplement hiervon als Templatnukleinsäure verlängert werden können. Als Primer können monovalente oder multivalente oder monofunktionelle oder multifunktionelle Agentien eingesetzt werden, die eine Nukleinsäure-abhängige Elongation zulassen. Diese Agentien können auch aus verschiedenen Molekülarten zusammengesetzt sein, z. B. Chimären aus PNA und Nukleotid(en) oder aus Protein/Peptid und Nukleotid(en). Bevorzugt können als Primer Oligomere oder Polymere einer Bindelänge von zwischen 9 und 30 nt, besonders bevorzugt zwischen 11 und 22 nt verwendet werden, die an die nachzuweisende Nukleinsäure T oder deren Komplement antiparallel binden und die als ein von mehreren Reaktionspartnern für eine enzymatische Replikation der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement wirken. Besonders bevorzugt werden als Primer Oligomere verwendet, die nach Zugabe eines Vermehrungsreagenzes durch Anlagerung zumindest eines Teils des Primers an die nachzuweisende Nukleinsäure oder deren Komplement eine gerichtete Replikation einer oder beider Stränge der nachzuweisenden Nukleinsäure oder deren Komplement initiiert. Ein Beispiel für einen besonders bevorzugten Primer ist ein Desoxyribooligonukleotid mit einem freien 3'-Hydroxyl-Ende.

Die als Primer eingesetzten Agentien können prinzipiell weitere Gruppen enthalten, wie z. B. Markierungen. Bevorzugt enthalten die Primer keine Modifikation, die später zur Detektion oder zur Immobilisierung der Amplifikate eingesetzt würde. Erforderlich ist nur, daß die Primer die geforderten Bindeeigenschaften zur nachzuweisenden Nukleinsäure bzw. ihrem Komplement haben und verlängerbar sind.

Unter einer Sonde wird ein Molekül verstanden, welches aufgrund von Basen-Basen-Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren hybridisieren kann und welches mit Hilfe der 5'-Nuclease-Aktivität der Taq-Polymerase, Tth-Polymerase oder anderer Polymerasen mit 5'-Nuclease-Aktivität oder clonierte, mutierte oder chimäre Polymerasen mit 5'-Nuclease-Aktivität stückweise abgebaut werden kann. Bevorzugte Sonden sind daher Oligodesoxyribonukleotide. Die Länge einer Sonde beträgt, bezogen auf die Bindesequenz D, bevorzugt zwischen 9 und 30 Basen. Die Sonde weist bevorzugt an unterschiedlichen Nukleotiden eine Reportergruppe, die Licht einer Wellenlänge absorbieren kann, und einen Quencher, der die eingestrahlte und von der Reportergruppe absorbierte Energie ganz oder teilweise übernehmen kann, sodaß eine Emission von Licht durch die Reportergruppe unterdrückt wird, auf. Details für die Herstellung einer solchen Sonde sowie die generellen Bedingungen für die Durchführung eines Nachweisverfahrens aufgrund dieses Prinzips sind in WO 92/22638, US-A- 5,210,015 sowie EP-A-0 699 768 beschrieben. Auf die Offenbarung dieser Patentanmeldungen sowie ihrer Äquivalente wird hiermit ausdrücklich Bezug genommen.

Unter einer Bindesequenz wird bevorzugt die Sequenz von Basen verstanden, die zwischen den äußersten, mit einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde über Basen-Basen-Wechselwirkung bindenden Basen einer bestimmten Nukleinsäure, einem Primer oder einer Sonde liegt, einschließlich dieser äußersten Basen.

Die als Sonde eingesetzten Agentien können eine oder mehrere Bindesequenzen D für eine oder mehrere nachzuweisende Nukleinsäuren oder deren Komplement, insbesondere jedoch für einen Strang des Amplifikats enthalten und können Sequenz-Modifikationen, endständige und/oder interne Sequenzergänzungen und/oder sonstige Modifikationen wie z. B. natürliche oder artifizielle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon, nicht funktionelle Nukleotidanaloga oder Äquivalente davon oder Basen-Analoga oder Äquivalente davon enthalten oder methyliert, gecappt oder polyadenyliert oder in sonstiger Weise modifiziert sein, solange die Bindung an einen Strang des Amplifikats möglich ist, und ein Abbau durch eine 5'-Nuklease möglich ist. Die Reportergruppe liegt bevorzugt in 5'-Richtung von der Quenchergruppe in einer Entfernung, die ein effektives Quenchern noch erlaubt.

In der vorliegenden Erfindung wird das Teilstück der Nukleinsäure, von welchem eine Vielzahl von Amplifikaten hergestellt werden soll, so ausgewählt, daß es drei Bereiche A, B und C enthält. Die Bereiche A und C sind Bereiche, die so gewählt werden, daß der eine Primer

die Sequenz A als Bindesequenz benutzen kann und das Komplement des Bereiches C als Bindesequenz für den anderen Primer dienen kann. Unter einem Komplement wird im Sinne der vorliegenden Erfindung eine zu einer bestimmten anderen Nukleinsäure, z. B. einem Sequenzbereich z. B. eines Amplifikats oder der nachzuweisenden Nukleinsäure im wesentlichen komplementäre Nukleinsäure oder Nukleinsäuresequenz verstanden.

Im wesentlichen komplementär bedeutet, daß die Basenpaarungen so gewählt sind, daß (für den Fall, daß eine Hybridisierung mit einer anderen Nukleinsäure, z. B. einer Sonde oder einem Primer) eine Hybridisierung unter den Testbedingungen noch erfolgen kann bzw. (für den Fall eines Verlängerungsprodukts eines Primers im Verhältnis zu dem eingesetzten Templat) die Nukleinsäure aufgrund einer Primerverlängerungsreaktion unter Verwendung der entsprechenden Nukleinsäure gebildet werden konnte. Im wesentlichen komplementär bedeutet daher oft, daß unter stringenten Bedingungen mehr als 90 % der Basen der betrachteten Nukleinsäure bzw. Sequenz mit der bestimmten Nukleinsäure bzw. Sequenz Basenpaarungen ausbilden.

Die Bereiche A und C sind erfindungsgemäß bevorzugt so lang, daß Bedingungen gefunden werden können, bei denen Primer einer entsprechenden Länge mit den Basen in diesen Bereichen hybridisieren können. Daher sind die Bereiche bevorzugt länger als 8, besonders bevorzugt länger als 12 Nukleotide. Auch bezüglich der Obergrenze der Länge der Bereiche A und C ergeben sich im Sinne der Erfindung bevorzugte Bereiche. Die Bereiche A und C sind jeweils bevorzugt kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 20 Nukleotide. Die Länge der Bereiche wird in einem besonderen Aspekt der Erfindung dadurch nach oben begrenzt, daß die Primer in für die nachzuweisende Nukleinsäure unspezifischer Weise daran hybridisieren können sollen. Daher ist die besonders bevorzugte Länge der Bindesequenzen A und C 12 bis 20 Nukleotide. Die Bereiche A und C auf der nachzuweisenden Nukleinsäure überlappen nicht miteinander.

Im Sinne der Erfindung enthalten das Teilstück der nachzuweisenden Nukleinsäure (welches dem Amplikon entspricht) und somit die hieraus gebildeten Amplifikate eine zwischen den Bereichen A und C gelegene Sequenz B (Fig. 1 bis 3). Diese Sequenz hat eine Länge von ein oder mehr Nukleotiden, bevorzugt mehr als 4, besonders bevorzugt mehr als 8 Nukleotide. Nach oben hin ist die Länge der Sequenz B durch die geforderte Gesamtlänge des Amplifikats begrenzt. In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die Sequenz B keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz der Sonde zugehören. Bevorzugt ist die Sequenz B

daher kleiner als 30, besonders bevorzugt kleiner als 15 Nukleotide. Die Sequenz B hat bevorzugt eine Länge von zwischen 4 und 30 Nukleotiden. Besonders bevorzugt ist die Länge der Sequenz B zwischen 8 und 15 Nukleotiden. Diese Sequenz oder das Komplement davon dienen im Sinne der Erfindung mit zur Bindung der Sonde. Die Länge der Sonde wird so gewählt, daß eine Hybridisierung mit dem Amplifikat möglich ist. Die Sequenz der Sonde wird so gewählt, daß sie eine Bindesequenz D enthält, welche durch die mit dem Amplikon Basen-Basen-Wechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde, insbesondere den zwischen den äußersten mit korrespondierenden Basen des Amplikons Basenwechselwirkung ausbildenden Nukleotide der Sonde definiert ist. Bevorzugt ist die Sonde im wesentlichen komplementär zu den Nukleotiden der Bindesequenz E des Amplifikats. Die Bindesequenz D bzw. D' kann zu dem Amplifikat zu 100 % komplementär sein, aber auch Mismatche zwischen den äußeren Enden der Bindesequenz aufweisen. Die Sonde kann neben der Bindesequenz weitere Gruppen oder Reste oder auch Nukleinsäure-bindende Bereiche enthalten (Fig. 3, V, VI).

Abhängig von der Länge des Bereiches B und der Länge der Bindesequenz D bzw. D' lassen sich unterschiedliche Fallgestaltungen treffen. In einem ersten Fall ist die Bindesequenz D oder D' länger als der Bereich B bzw. B' des Amplikons. In diesem Fall reicht die Bindesequenz D bzw. D' in einen oder beide Bereiche A bzw. A' und C bzw. C' des Amplikons hinein. Diese Fälle sind in Fig. 3, II bis IV gezeigt. In diesen Fällen enthält das Amplifikat zwischen den voneinander wegweisenden Enden der Bereiche A und C keine Nukleotide, die nicht der Bindesequenz E oder den Bindesequenzen der Primer zugehören. Die Bindesequenz D der Sonde überlappt in Fig. 3, II und III mit einer der beiden Bindesequenzen der Primer.

In einem weiteren Fall entspricht die Länge des Bereiches B der Länge des Bereiches D, so daß die Bindesequenz der Sonde nicht mit den Bindesequenzen der Primer überlappt (Fig. 3, I). Bevorzugt im Sinne der Erfindung überlappt der Bereich D bzw D' nicht mit dem in 5'-Richtung gelegenen Bereich A, A', C oder C'.

Das erfindungsgemäße Verfahren beinhaltet in einer bevorzugten Ausführungsform die Bildung von dreiteiligen Mini-Amplikons (Tripartite-Mini-Amplikon), die neben den Primer und Sonde bindenden Sequenzen keine zusätzlichen Sequenzen aufweisen und somit die Nachteile bei Bildung von längeren Nukleinsäure-Vermehrungsprodukten vermeiden, wobei andererseits die Spezifität des gesamten Amplifikationsformats durch Bindung der Primer,

durch Bindung der Sonde und durch Ablauf der targetabhängigen enzymatischen Elongationsreaktion mit allen 4 Nukleotid- bzw. Basenspezifitäten oder natürlicher oder artifizieller Analoga, Isomere oder Äquivalente davon aber sichergestellt wird. Das erfundungsgemäße Vermehrungsverfahren wird daher auch als Mini-Chain-Reaction (MCR) bezeichnet.

Die Vermehrung der nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen oder deren Komplement erfolgt, wenn im folgenden nichts anderes ausgesagt ist, unter Befolgung der dem Fachmann bekannten Reaktionsschritte und Reaktionsbedingungen. Ein Unterschied zu den herkömmlichen Verfahren ist der Einsatz der speziell ausgewählten Primer und Sondensequenzen, welche die Bildung und Vermehrung des Mini-Tripartite-Amplikons erlauben. Wesentlich im Sinne der Erfindung ist die Zugabe von einem oder mehrerer Primer, die an die Primer-Bindesequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäure, des Tripartite-Mini-Amplikons beziehungsweise deren Komplemente binden.

Allgemein üblich ist die Zugabe zur Vermehrung befähigender Vermehrungsreagentien. Bevorzugt können als Vermehrungsreagentien enzymatisch aktive Komponenten (z. B. Enzyme) in Kombination mit Elongationssubstraten und geeignete Hilfsreagentien (wie Puffer) verwendet werden. Bevorzugte Elongationssubstrate sind Nukleinsäurebausteine oder natürliche oder artifizielle Analoga oder Isomere oder Äquivalente davon. Als Elongationssubstrate werden Agentien eingesetzt, die zum Aufbau eines Gegenstrangs der nachzuweisenden Nukleinsäure geeignet sind. Bevorzugt werden als Elongationssubstrate Nukleotide eingesetzt. Bevorzugte Nukleotide sind dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP, dITP, iso-dGTP, iso-dCTP, deaza-dGTP und ATP, GTP, CTP, UTP und/oder ITP, deazaGTP, iso-GTP, iso-CTP.

Besonders bevorzugt werden im Fall der PCR als Nukleinsäure-Vermehrungsreagentien Mischungen aus meta- oder thermostabilen enzymatischen DNA-Polymerase-Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und/oder Ribonukleotiden und geeignete Hilfsreagenzien verwendet, z. B. T.aq.-DNA Polymerase in Kombination mit dATP, dGTP, dCTP, dTTP und/oder dUTP und Hilfsreagentien wie z. B. Salze und ggf. Detergentien. Besonders bevorzugt werden im Fall der RT-PCR als Vermehrungsreagentien Mischungen, Komplexe oder Domänen aus thermostabilen enzymatischen Reverse Transkriptase- und DNA-Polymerase-Aktivitäten und Mischungen von Desoxyribo- und Ribonukleotiden und

geeignete Hilfsreagentien verwendet, z. B. Mischungen aus AMV oder Mo-MLV-Reverse Transkriptase.

Bei den thermozyklischen Vermehrungsreaktionen (z. B. PCR, RT-PCR) werden 2- oder 3phasige Zyklen durchgeführt, bevorzugt 2-phasige Zyklen. Bei den 2-phasigen Zyklen wird die Strangtrennung der Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte bei hoher Temperatur, bevorzugt 85 °C - 95 °C, durchgeführt, das gemeinsame Primer- und Sonden-Annealing und Primer-Elongation bei Temperaturen nahe dem Schmelzpunkt zwischen Primer und Elongationsgegenstrang bzw. Primer und Sonde und Elongationsgegenstrang, bevorzugt zwischen 48 °C und 72 °C. Die Strangtrennung erfolgt durch Energiezufuhr und/oder enzymatisch, bevorzugt durch erhöhte Temperatur, Mikrowellen oder das Anlegen einer Spannung über eine Mikroelektrode, besonders bevorzugt durch erhöhte Temperatur. Es werden bis zu 80 Thermozyklen durchgeführt, bevorzugt bis zu 60 Zyklen. Es wird bis zu 4 Stunden inkubiert, bevorzugt 30 - 120 Minuten. Die Vermehrungsreaktion kann in Reaktionsgefäß, Kapillaren oder miniaturisierten Reaktionskammern erfolgen, die auch Teil eines integrierten Reaktionschips sein können. Die Fluoreszenzmessung erfolgt während der Amplifikationsreaktion kontinuierlich oder innerhalb kurzer Zeitintervalle, bevorzugt mehrfach während eines Temperaturcyclus, besonders bevorzugt 3fach oder öfters während eines Temperaturcyclus. Die Vermehrungsreaktion kann eine interne Kontrolle und/oder Kalibrator enthalten. Die Kontrolle kann auch extern durch eine zusätzliche Vermehrungsreaktion erfolgen.

Bei Verwendung von dUTP anstelle von oder in Ergänzung zu dTTP wird durch die DNA-Polymerase-Aktivität dUMP anstelle von dTMP in die vermehrte Nukleinsäuresequenz oder deren Komplement eingebaut. Dies erlaubt durch Inkubation mit der Enzymaktivität Uracil-Deglycosylase, bevorzugt mit einer thermolabilen Ausführungsform der Enzymaktivität, bei der die Renaturierung nach thermischer Denaturierung der Enzymaktivität langsamer erfolgt, die Fragmentierung des Vermehrungsprodukts und somit seiner Eigenschaft als Nukleinsäure-Vermehrungseinheit. Die Inkubation des UMP-haltigen Vermehrungsprodukts kann im Anschluß an die Nukleinsäure-Vermehrungs- und Nachweisreaktion (Sterilisierung) und/oder vor einer erneuten Nukleinsäure-Vermehrungsreaktion (Carry over-Prävention) erfolgen.

Alternativ können auch Psoralen und/oder Isopsoralen und Derivate davon und Bestrahlung mit UV-Licht zur funktionellen Inaktivierung des Nukleinsäure-Vermehrungsprodukts verwendet werden.

Der Nachweis der Bildung der Amplifikate erfolgt mit der Sonde, die an die Bindesequenz B des Amplikons zu einem Hybrid bindet. Die wirkt als Substrat zur Freisetzung einer Reportergruppe aus ihr. Die Enden der Bindesequenz der Sonde liegen zwischen den äußeren Enden der Primer-Bindesequenzen. Die Sonde ist somit hybridisierbar mit einem Strang des Amplifikats.

Die Bindung der Sonde kann unter Benutzung bekannter Bedingungen geschehen. Denn bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform der sogenannten Hybridisierungstests, die in ihren Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nukleinsäurediagnostik bekannt sind. Soweit experimentelle Details im folgenden nicht ausgeführt sind, wird dazu vollinhaltlich auf "Nucleic acid hybridisation", Herausgeber B.D. Hames und S.J. Higgins, IRL Press, 1986, z. B. in den Kapiteln 1 (Hybridisation Strategy), 3 (Quantitative Analysis of Solution Hybridisation) und 4 (Quantitative Filter Hybridisation), Current Protocols in Molecular Biology, Ed. F.M. Ausubel et al., J. Wiley and Son, 1987, und Molecular Cloning, Ed. J. Sambrook et al., CSH, 1989, Bezug genommen. Zu den bekannten Methoden gehört auch die chemische Synthese von modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotiden und die Auswahl von Hybridisierungsbedingungen, durch welche eine Spezifität erreicht werden kann, die unter anderem vom Ausmaß der Homologie zwischen den zu hybridisierenden Nukleinsäuren, deren GC-Gehalt und deren Länge abhängt.

Die Sonde wird im erfindungsgemäßen Verfahren entweder vor oder während der Amplifikationsreaktion zugegeben, bevorzugt in Form einer Lösung, gewünschtenfalls zusammen mit den Primern. Dabei werden Reagenzbedingungen eingestellt, die eine Hybridisierung der Sonde mit einem Amplifikat erlauben.

Die Bindung zwischen der vermehrten Nukleinsäuresequenz des Amplikons und/oder dessen Komplement und der Sonde erfolgt während der Amplifikation, sodaß das Enzym bei der Verlängerung eines Primers die Sonde von ihrem 5'-Ende her abbauen kann. hierdurch wird die Reportergruppe freigesetzt, bevorzugt in Form von Mononukleosidbausteinen. Dadurch wird der Quenchprozess unterbunden und die

Reportergruppe kann Licht emittieren, welches als Signal gemessen wird und als Zeichen für die Anwesenheit der Nukleinsäure verwendet wird.

Bei Verwendung mehrerer Sonden oder multifunktionaler Sonden oder Sonden, die mehrere Bindesequenzen für Amplifikate verschiedener nachzuweisenden Nukleinsäuren oder deren Komplemente aufweisen, können mehrere unterschiedliche Amplifikate oder deren Komplemente gebunden werden. Dabei erlaubt die Bildung von Tripartite-Mini-Amplikons bevorzugt ähnlicher Länge, besonders bevorzugt solcher Tripartite-Mini-Amplikons gleicher Länge, bei der Nukleinsäurevermehrung die Einstellung vereinheitlichter Inkubationsbe-

dingungen für die Bildung der unterschiedlichen Bindekomplexe. Dies erlaubt den parallelen und/oder sequentiellen Nachweis mehrerer Nukleinsäuresequenzen im Rahmen von Multiplex-Verfahren. Unter einem Multiplex-Amplifikationsverfahren wird meist ein Verfahren verstanden, bei dem entweder unterschiedliche Sequenzen auf einer Nukleinsäure (z. B. unterschiedliche Regionen eines Gens) oder aber unterschiedliche Sequenzen auf unterschiedlichen Nukleinsäuren, z. B. aus unterschiedlichen Organismen, z. B. unterschiedlichen Viren, gleichzeitig in einer Amplifikationsmischung vermehrt werden. Solche Verfahren stellen hohe Anforderungen an die Reaktionsbedingungen, da für eine zuverlässige Auswertung die Amplifikationen für die unterschiedlichen Sequenzen eine ähnliche Amplifikations-Effizienz haben müssen. Einen der Einflußfaktoren für unterschiedliche Effizienz auszuräumen, ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Dazu unterscheiden sich die Ampliconlängen bevorzugt um nicht mehr als 20 %, besonders bevorzugt um nicht mehr als 5 Nukleotide.

In einer besonderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Multiplexverfahrens werden Amplicons der verschiedenen Sequenzen hergestellt und anschließend die Summe der gebildeten Amplicons bestimmt. Dabei wird bevorzugt ein Nachweisverfahren eingesetzt, bei dem eine Markierung für alle Nachweise verwendet werden kann; so können beispielsweise alle Sonden für die einzelnen Amplifikate gleich markiert sein, z. B. mit dem gleichen Ruthenium-Komplex. Dieses Vorgehen ist insbesondere für Tests in Proben aus Blutbanken vorteilhaft, da es bei der weiteren Verwendbarkeit der Proben für Blutspenden nicht auf die Art einer Infektion ankommt, sondern die Probe schon dann nicht mehr als Blutspendematerial in Frage kommt, wenn irgendeine getestete Infektion (z. B. HIV oder HBV) vorliegt.

Bei den Multiplex-Amplifikationsverfahren unterscheidet man zwischen echten und unechten Multiplex-Verfahren. Bei unechten Verfahren werden die Primer aus stark konservierten Regionen der Analytnukleinsäuren ausgewählt, derart, daß mit dem einen Set von (2) Primern alle nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen amplifiziert werden. Bei echten Multiplex-Verfahren wird ein Gemisch von mehr als 2 Primern eingesetzt, von denen mindestens 2 eine unterschiedliche Selektivität haben. Einer oder mehrere der Primer können für alle oder ein Unterset von nachzuweisenden Nukleinsäuren spezifisch sein. Dieses Verfahren ist insbesondere dann vorzuziehen, wenn wenig verwandte Sequenzen nebeneinander amplifiziert werden sollen

Mit Multiplex-Verfahren können verschiedenste Kombinationen von nachzuweisenden Nukleinsäuresequenzen nebeneinander amplifiziert werden, z. B. verschiedene Subtypen eines Virus oder Bakterien verschiedener Genera oder Spezies.

Der Nachweis der freigesetzten Reportergruppe kann in für den Fachmann bekannten Verfahren, insbesondere in verschiedenen Ausführungsformen erfolgen, bevorzugt basierend auf Fluoreszenzmessungen.

Im Fall der gequenchten Fluoreszenzmarkierungen erfolgt eine Fluoreszenzaktivierung durch Dequenching nach Bindung der Detektions-Sonde an das entstehende Tripartite-Mini-Amplikon und 5'-nukleolytischer Abbau und Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoff-modifizierten Nukleotids. Die Messung der resultierenden Fluoreszenzsignale erfolgt jeweils bevorzugt durch Real time-Messungen. In einer besonderen Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Fluorescein und Rhodamin oder Derivate davon als Fluoreszenz- und Quencher-Komponenten verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden bei den gequenchten Detektorsonden Ruthenium- oder Rhenium-Chelate und Quinone oder Derivate davon als Elektrochemilumineszenz- und Quencher-Komponenten verwendet.

Besonders bevorzugt im Sinne dieses ersten Aspekts der Erfindung sind solche Ausführungsformen, bei denen mindestens eine der Bindesequenzen der Primer und der Sonde nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist. Spezifisch im Sinne der Erfindung ist eine Sequenz dann, wenn sie aufgrund einer fortlaufenden Sequenz von Nukleobasen prinzipiell in der Lage wäre, unter stringenten Bedingungen nur mit einer Sequenz auf der nachzuweisenden Nukleinsäure, nicht jedoch mit Nukleinsäuren anderer, nicht nachzu-

weisender Organismen oder Spezies oder Gruppen von Organismen zu binden. Bevorzugt ist eine Sequenz dann nicht für eine Sequenz spezifisch, wenn sie unter den Bedingungen, welche für die Durchführung des Nachweises eingestellt werden, mit anderen Nukleinsäuren hybridisiert.

Homologien zu anderen Genomen (Sequenzen) lassen sich mit Hilfe einer definierten Ausgangssequenz identifizieren. Verwendet wird eine z. B. über das Internet für jeden zugängliche Suchmaschine mit Namen "BLAST" (Basic Local Alignment Search Tool) (Homepage-Adresse: ><http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/><).

Diese ermöglicht den Zugriff auf diverse andere Sequenz- und Proteindatenbanken, von denen als am wesentlichsten zu benennen sind:

GenBank, EMBL, DDJB, PDB, PIR und Swiss-Prot.

Es werden auch BLASTN-Verfahren gemäß Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 im Rahmen von UWGCG Suchverfahren verwendet.

Die Suchverfahren werden auch auf Sequenzdatenbanken wie z.B. die EMBL-Sequenzdatenbanken, bevorzugt auch virale Sequenzdatenbanken wie z.B. em-vrl angewandt.

Das Blast-Programm bietet dem Anwender zahlreiche Anpassungsmöglichkeiten, um eine individuelle Suche ausführen zu können, d. h. solche Sequenzen zu identifizieren, die für einen oder mehrere Analyten spezifisch sind, oder die eben nicht spezifisch sind, d. h. auch in anderen Organismen vorkommen oder nicht. Hierzu wird auch verwiesen auf Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 403-410. Erstaunlicherweise ergibt sich nämlich die Selektivität des Nachweisverfahrens nicht allein aus der Selektivität der einzelnen Primer für ein spezifisches Target, sondern aus der kumulierten Selektivität des Gesamtsystems. So können sogar zwei Primer oder zwei Primer und eine Sonde, einzeln völlig unselektiv sein, d. h. einzeln mit einer Vielzahl von Targets hybridisieren; dadurch, daß sich die Selektivitäten der einzelnen Primer und Sonde (nur) in der nachzuweisenden Nukleinsäure überlagern, ist eine Gesamtspezifität gegeben. Dadurch, daß man auf die Selektivität der Primer aber bei der Auswahl der zu amplifizierenden und nachzuweisenden Nukleinsäure nicht so sehr festgelegt ist, ist es viel besser möglich, für unterschiedliche Targets kurze Amplicons zu

lokalisieren, die in ihrer Länge vollständig oder weitgehend (d. h. über 95 %) übereinstimmen. Dies macht Simultan-Amplifikationen und -Hybridisierungen (wie im Falle von Nukleinsäuresondenarrays) besser realisierbar und reproduzierbar.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenzkit zur Durchführung dieses Verfahrens. Dieses enthält die Primer und bevorzugt auch eine Nachweissonde. Es kann jedoch auch weitere Reagenzien, wie Puffer und Enzyme, z. B. eine Polymerase, enthalten.

Bevorzugt binden die Primer an die Bindesequenzen A bzw C', wie oben beschrieben, und ~~die Sonde an einen zwischen den Enden der Bindesequenzen A und C' gelegenen Bereich B~~ oder das Komplement davon.

Auch bei der Verwendung von mindestens einer Sequenz aus den 3 Sequenzbereichen der beiden Primer und der Sonde, die nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure ist, bleibt die Gesamtspezifität des Nachweisverfahrens erhalten. Ist eine der Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, sondern bindet auch an andere Nukleinsäuren, kann kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, da die zweite Primerbindungssequenz fehlt. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte auf der anderen Nukleinsäure werden nicht detektiert, da die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist auch die zweite Primersequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann nur dann ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt auf der anderen Nukleinsäure gebildet werden, wenn beide Primerbindungssequenzen in der gleichen Nukleinsäure-Vermehrungseinheit sind. Dieses Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt wird ebenfalls nicht detektiert, da die spezifische Bindungssequenz für die Sonde fehlt. Ist die Sondensequenz nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, jedoch die beiden Primer spezifisch, werden keine Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure gebildet. Ist zusätzlich zur Sondensequenz auch eine der beiden Primersequenzen nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, kann wiederum kein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet werden. Unspezifische Nukleinsäure-Vermehrungsprodukte der anderen Nukleinsäure, die möglicherweise gebildet werden, enthalten andere Sequenzen im Sondenbindungsbereich und werden daher nicht detektiert. Sind alle drei Bindungssequenzen für die beiden Primer und die Sonde nicht spezifisch für die nachzuweisende Nukleinsäure, wird kein Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt gebildet, wenn mindestens eine der beiden Primersequenzen nicht in einer Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der anderen

Nukleinsäure liegt. Liegt die Sondensequenz nicht in der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit der beiden Primersequenzen für die andere Nukleinsäure, kann zwar ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet, aber nicht detektiert werden. Der einzige Fall, daß ein spezifisches Nukleinsäure-Vermehrungsprodukt der anderen Nukleinsäure gebildet und detektiert werden kann, ist, wenn alle drei Sequenzen innerhalb eines Nukleinsäure-Vermehrungsbereichs liegen. Dies kann jedoch durch entsprechende Sequenzauswahl der Nukleinsäure-Vermehrungseinheit vermieden werden, z. B. indem die Primerhybridisierungsstellen nicht gleichzeitig aus demselben Locus desselben nicht nachzuweisenden Organismus gewählt werden.

In einer weiteren Ausführungsform findet die Herstellung der Amplifikate unter Einsatz von Nukleotiden, besonders bevorzugt Mononukleotiden, welche jeweils zu A, G, C und/oder T komplementär sind, statt. Bevorzugt enthält der Bereich B bzw. B' der nachzuweisenden Nukleinsäure alle 4 natürlichen Nukleobasen.

Ein technischer Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß bei Mehrfachbestimmungen einer Probe ein hoher Grad an Übereinstimmung der Meßwerte erreicht wird.

Im folgenden sollen die beiden Aspekte der vorliegenden Erfindung anhand eines Nachweises für HCV beschrieben werden. Die Nukleinsäuresequenz von HCV ist beispielsweise in EP-B-0 318 216 beschrieben. In FIG. 4 ist ein Ausschnitt aus einem HCV-Genom gezeigt, welches Grundlage des beispielhaft gezeigten Verfahrens ist. Die Sequenz aus HGBV-B, die der HCV-Sequenz entspricht und aus der die Sequenzen für die Primer und Probes entnommen sind, sind ebenfalls in FIG 4 gezeigt.

Der Nachweis von HCV-RNA ist überraschenderweise trotz der kurzen vermehrten Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure auch spezifisch und reproduzierbar in positiven HCV-Plasmaproben möglich, in denen die HCV-RNA nicht sequenzspezifisch vorgereinigt wurde, sondern direkt aus lysierten und über Glasoberflächen aufkonzentrierten Plasmaproben eingesetzt wurde. HCV-negative Plasmaproben ergeben kein Signal. Dies ist insofern überraschend, da das HCV-RNA-Genom sehr labil ist gegenüber Fragmentierung in Plasma-Lysaten. Mit z. B. HIV-Plasmaproben, HBV-Serumproben, Chlamydiaproben aus Urin oder Human-DNA-Proben aus Vollblut, die ebenfalls über Glasoberflächen auf-

konzentriert wurden, wird mit den eingesetzten Primern und Sonden ebenfalls kein Signal erhalten.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann verwendet werden, um einen oder mehrere der für den Stand der Technik geschilderten Nachteile zu vermeiden oder um einen oder mehrere der folgenden Vorteile zu realisieren. Die PCR-Zyklen können sehr viel kürzer sein. Die Gesamtzeit der Nachweisverfahren kann dadurch verkürzt werden. Die Sensitivität des Nachweises kann erhöht werden, da weniger Kompetition/Verdrängung zwischen dem kurzen Gegenstrang des Amplikons und der Detektorsonde stattfinden kann. Die Spezifität des Nachweises wird erhöht, da der relative Anteil der internen Detektorregion gegenüber der gesamten Amplikonlänge erhöht wird. Die Differenzierbarkeit von Subtypen kann erhöht werden. Der Nachweishintergrund kann gesenkt werden, da kurze Amplika weniger Potential für unspezifische Hybridisierung mit sich bringen. Aus diesem Grund kann das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse kann erhöht werden, da kleinere Targetregionen auf RNA-Genomen weniger sensitiv für RNA-Abbau sind. Die Möglichkeiten zur Ausbildung von Sekundärstrukturen werden reduziert.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert:

Allgemeines

Alle verwendeten Oligonukleotide sind linear und einzelsträngig.

Beispiel 1

Nachweis von HCV aus menschlichem Blut

a) Probenvorbereitung:

Die RNA-Isolierung aus Plasma erfolgte anhand folgenden Probenvorbereitungsprotokolls:

1. Plasma (420 µl) mit 80 µl Proteinase K (25 mg/ml) mischen und einige Sekunden vortexen
2. Zugabe von 500 µl Lysepuffer (inkl. 1 µg Carrier-RNA (polyA)/ml): 5,4 M Guanidinium-Thiocyanat; 10 mM Harnstoff; 10 mM Tris-HCl; 20 % Triton X 100; pH 4,4
3. vortexen und anschließend 10 min bei RT schütteln
4. Zugabe von 500 µl Isopropanol-MGP (6 mg magnetische Glaspartikel in Isopropanol)
5. vortexen und anschließend 20 min bei RT schütteln
6. Magnetseparation der MGPs
7. Überstand abnehmen und verwerfen
8. Zugabe von 750 µl Waschpuffer: 20 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 70 % Ethanol
9. MGPs auf Vortex resuspendieren und erneute Magnetseparation
10. Waschvorgang insgesamt 5mal wiederholen
11. Zugabe von 100 µl DEMC-Wasser zur Elution
12. 15 min bei 80 °C schütteln
13. Magnetseparation
14. 10 µl des Eluats in die RT-PCR einsetzen

b) Klonierung und Präparation des RNA-Standards:

Der Wildtypstandard "pHCV-wt" wurde zunächst durch Amplifikation eines Abschnitts des HCV-Genoms mit den Primern KY80 (5'-gcagaaaggcttagccatggcgt-3', SEQ.ID.NO.1) und KY78 (5'-ctcgcaagcacctatcaggcgt-3', SEQ.ID.NO.2) gewonnen und das Amplikon anschließend über eine sog. "blunt-end"-Klonierung in den Vektor pBluescript SK+ kloniert. Nach Vermehrung der bakteriellen Zellen wurde das Plasmid isoliert, durch restriktionsenzymatischen Verdau linearisiert und über eine in-vitro-Transkription das entsprechende RNA-Fragment gewonnen und aufgereinigt.

Die Quantifizierung der RNA erfolgte über photometrische Messung der Absorption bei 260 nm.

Alle hier beschriebenen molekularbiologischen Verfahren können einschlägigen Methodik-Büchern entnommen werden (e.g. Maniatis et al.; Ausubel et al.).

c) RT-PCR assay:

Die Amplifikation erfolgte analog zu dem in EP-A-0 699 768 beschriebenen Verfahren. Weitere Details zur Konstruktion von Sonden für fluorogen markierte Sonden für das TaqMan™-Verfahren sind in der Produktbeschreibung für die Geräte TaqMan™ LS-50B und ABI Prism 7700 von Perkin Elmer beschrieben. Die Versuche wurden vorgenommen mit folgenden Primer- und Sondensequenzen:

forward Primer: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 390 und 417,
reverse Primer: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 421 und 448,
Sonde: ausgewählt aus der Sequenz zwischen den Positionen 408 und 440, alle bezogen auf die HGBV-B Sequenz aus der Sequenz HG22304 erhältlich aus der EMBL-Datenbank em-vrl, oder aus Proc. Natl. Acad. Sci USA 1995, 92, 3401-3405 und/oder aus J. Virlo. 69: 5621-5630. Die in Figur 4 gezeigte Sequenz entspricht den Positionen 390 bis 448 dieser Sequenz, so daß die Primer- und Sondenpositionen direkt umrechenbar sind.

Bevorzugte Primer-/Sonden-Kombinationen ergeben sich folgendermaßen:
forward-Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 390-406, 390-408, 391-406, 391-408, 392-406, und 392-408,

reverse Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 427-448, 427-447, 427-446, 428-448,
428-447, 428-446, 429-448 und 429-447,

Sonde ausgewählt aus einer der Sequenzen: 408-436, 408-435, 408-434, 408-433, 408-
432, 408-431, 408-430, 408-429, 408-428, 409-436, 409-435, 409-434, 409-433, 409-432,
409-431, 409-430, 409-429, 409-428, 410-436, 410-435, 410-434, 410-433, 410-432, 410-
431, 410-430, 410-429, und 410-428, oder, bevorzugt:

forward-Primer: Sequenz von 390-406, 390-408, 391-406, 391-408, 392-406, und 392-
408,

reverse Primer: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 423-448, 423-447, 423-446, 423-445,
423-444,

Sonde: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 409-433, 409-432, 409-431, 410-433, 410-
432, , 410-431, 410-430, 410-429, 410-428, 409-430, 409-429, 409-428, 408-433, 408-
432, 408-431, 408-430, 408-429, und 408-428 oder, besonders bevorzugt:

forward Primer: Sequenz von 390-406, 391-406, und 392-406,

reverse Primer ausgewählt aus einer der Sequenzen: 423-448, 423-447, 423-446, 423-445,
423-444,

Sonde: ausgewählt aus einer der Sequenzen: 409-433, 409-432, 409-431, 410-433, 410-
432, , 410-431, 410-430, 410-429, 410-428, 409-430, 409-429, 409-428, 408-433,
408-432, 408-431, 408-430, 408-429, und 408-428 .

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure umfassend die Schritte

- Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann, in
~~Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den~~
Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und
- Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist,

dadurch gekennzeichnet, daß die mit Hilfe der Primer gebildeten Amplifikate eine Länge von weniger als 100 Nukleotide aufweisen.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindesequenz D der Sonde mit einer der Bindesequenzen der Primer nicht überlappt.
3. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine der Bindesequenzen nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
4. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Gesamtlänge der Bindesequenzen von dem von der Bindesequenz der Sonde wegweisenden Teil der Bindesequenz des einen Primers bis zu dem ebenfalls von der Bindesequenz der Probe wegweisenden Teil des anderen Primers kleiner ist als 60 Nukleotide.
5. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde sowohl durch einen Fluoreszenzquencher als auch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist.

6. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens einer der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch ist.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwei der Primer nicht für die nachzuweisende Nukleinsäure spezifisch sind.
8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde nicht spezifisch ist für die nachzuweisende Nukleinsäure.
9. Verfahren gemäß einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß in der Amplifikation jeweils zu A, G, C und T komplementäre Nukleotide eingesetzt werden.

Zusammenfassung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure enthaltend die Schritte Herstellung einer Vielzahl von Amplifikaten eines Teilstücks dieser Nukleinsäure mit einer Länge von weniger als 100 Nukleotiden mit Hilfe zweier Primer, von denen einer an eine erste Bindesequenz (A) eines Strangs der Nukleinsäure binden kann und von denen der andere an eine zweite Bindesequenz (C'), die zu einer mit A nicht überlappenden, in 3'-Richtung von A gelegenen Sequenz C im wesentlichen komplementär ist, binden kann, in Anwesenheit einer Sonde mit einer Bindesequenz D, welche an die zwischen den Sequenzen A und C gelegene dritte Sequenz (B) oder das Komplement (B') davon binden kann, wobei diese Sonde eine Reportergruppe und eine Quenchergruppe enthält, unter Verwendung einer Polymerase mit 5'-Nukleaseaktivität und Nachweis der Nukleinsäure durch Messung eines Signals, welches durch die Freisetzung der Reportergruppe bedingt ist.

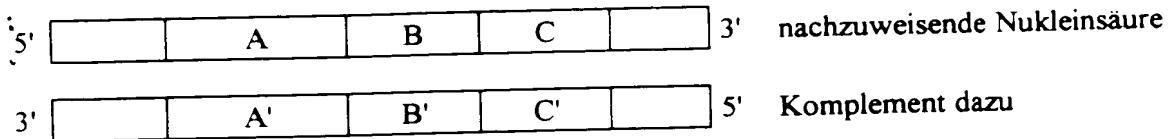
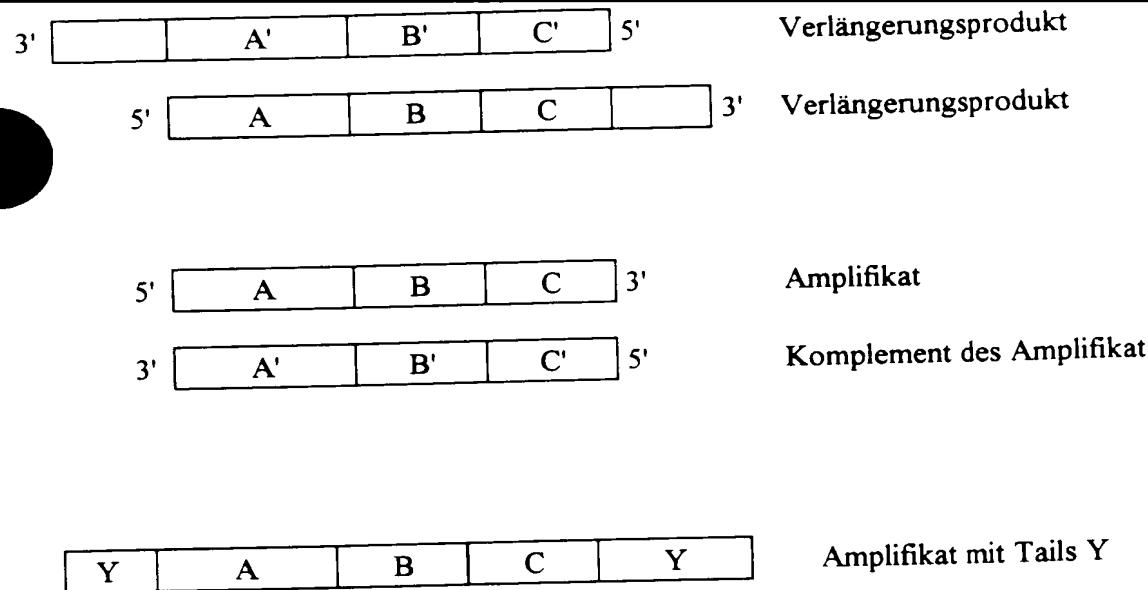
Fig. 1**Fig. 2**

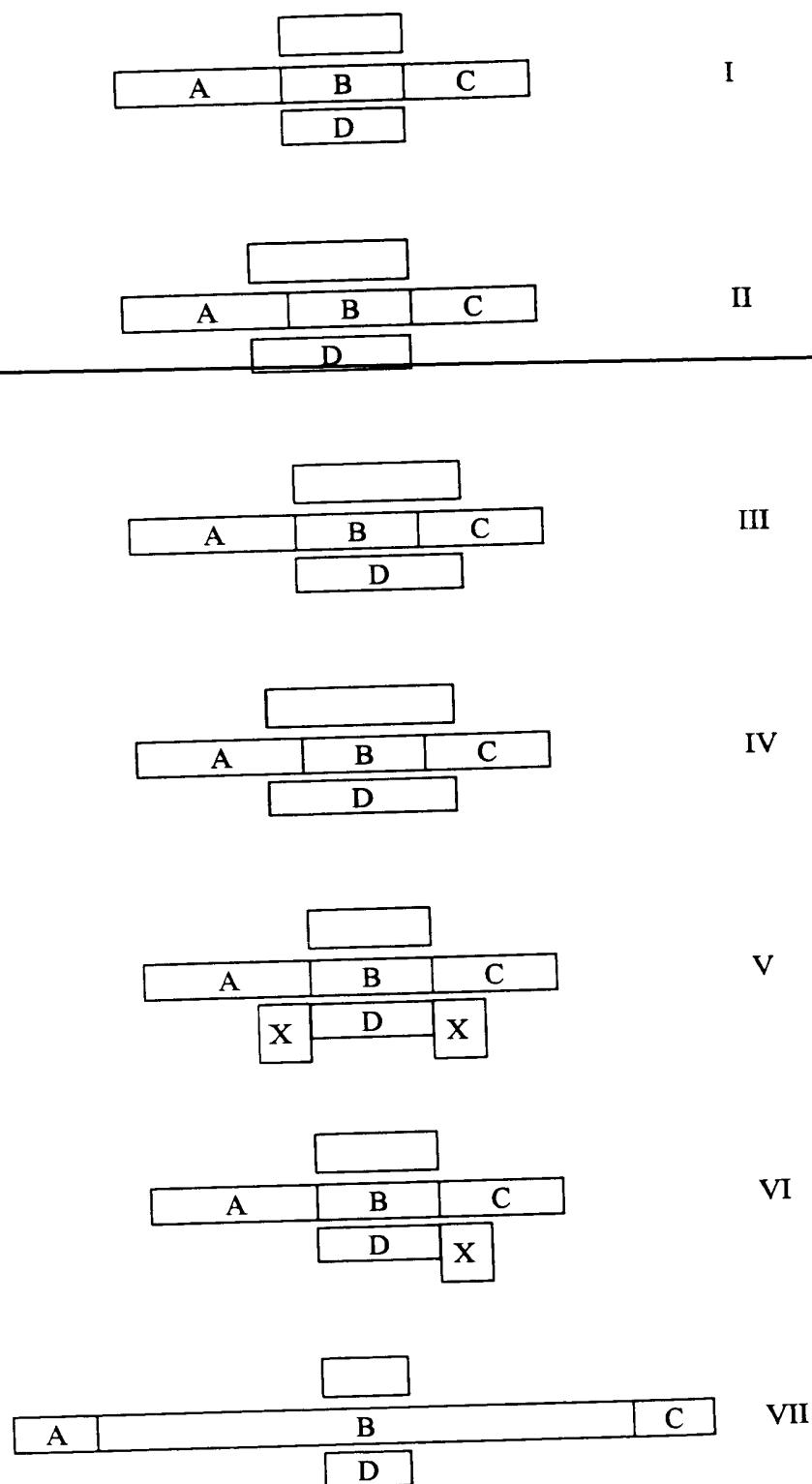
Fig. 3

Fig. 4

HCV:

5'-GTACTGCCTG ATAGGGTGCT TGCGAGTGCC CCGGGAGGTC TCGTAGACCG
TGCACCATG-3'

HGBV-B:

5'-GTACTGCCTG ATAGGGCCT TGCGAGGGGA TCTGGGAGTC TCGTAGACCG
TAGCACATG-3'



...